

EINFLUSS VON NEUROLEPTIKAMEDIKATION
AUF DIE ZELLULÄRE
IMMUNREAKTION IN-VITRO

Aloisius Baur

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der psychiatrischen Klinik der Universität
München (Direktor: Professor Dr. H. Hippus)
und der Arbeitsgruppe Immungenetik am Institut
für medizinische Virologie und Immunologie des
Universitätsklinikum Essen - GHS (Leiter: Pro-
fessor Dr. H. Grosse-Wilde)

EINFLUSS VON NEUROLEPTIKAMEDIKATION AUF DIE
ZELLULÄRE IMMUNREAKTION IN-VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Aloisius Baur

aus

Dinkelshausen

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Grosse-Wilde

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Hippius

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.1982



Gliederung

1. Einleitung und Literaturüberblick
 - 1.1 Neuroleptika und ihre Nebenwirkungen
 - 1.2 Das in-vitro Modell der zellulären Immunreaktion
 - 1.3 Medikamente und Lymphozytentransformation
 - 1.4 Direkte Wirkung von Neuroleptika in der Lymphozytenkultur
2. Ziel und Aufbau der Untersuchungen
3. Methoden
 - 3.1 Lymphozytenisolierung und Cryokonservierung
 - 3.2 Lymphozytentransformationstest in-vitro
 - 3.3 Aufarbeitung und Quantifizierung der Lymphozytentransformation
4. Ergebnisse
 - 4.1 Durchschnittliche Mitogen-Stimulationsraten
 - 4.2 Medikamente und Patienten
 - 4.3 Longitudinal-Studie der Mitogen-Antwort
 - 4.4 Bezug zwischen Neuroleptika und der Mitogen-Antwort
5. Diskussion
6. Zusammenfassung
7. Literatur
8. Danksagung
9. Lebenslauf

1. Einleitung und Literaturüberblick

1.1 Neuroleptika und ihre Nebenwirkungen

Seit etwa 1950 werden zur Behandlung von manischen und schizophrenen Psychosen Neuroleptika mit Erfolg eingesetzt. Neben das klassische Neuroleptikum Chlorpromazin, ein Phenothiazinderivat, sind bis heute eine Vielzahl von Substanzen getreten, von denen die gebräuchlichsten der Phenothiazinreihe oder der Butyrophenonreihe angehören. Bei nahezu allen diesen Substanzen sind neben den gewünschten antipsychotischen Wirkungen Nebenwirkungen zu verzeichnen: Hierzu gehören endokrine Veränderungen wie Cushing-ähnliche Syndrome mit Gewichtszunahme, bei Frauen Menstruationsstörungen und Galaktorrhöen und bei Männern Potenzstörungen und Gynäkomastien.

Das Interesse der Immun-Hämatologen erregten Neuroleptika, vor allem die trizyklischen Substanzen, wegen ihrer Wirkungen auf das hämatopoetische Knochenmark. Pisciotta (49) beobachtete bei 2000 von 6200 Patienten (32,2 %) unter Phenothiazintherapie eine mäßige passagere Leukopenie. Eine definitive Agranulozytose trat mit einer Inzidenz von 1:1200 auf. Nach Müller (42) gehören die Phenothiazine zu den zweithäufigsten Ursachen einer Agranulozytose; in den USA stehen sie an erster Stelle. Der zur Agranulozytose führende Pathomechanismus scheint nicht allergischer Natur zu sein, sondern auf einem direkt toxischen Effekt auf das Stammzellpotential des Knochenmarkes zu beruhen. Hinweise hierfür sind der schleichende Verlauf, die Abhängigkeit von der Gesamtdosis, die Reversibilität und das Nichtwiederauftreten bei Patienten, die trotz früherer Agranulozytose wieder mit Neuroleptika behandelt wurden (42,49,50).

Das trizyklische Neuroleptikum Clozapin war wegen seiner guten antipsychotischen Wirksamkeit und fehlender extrapyramidalmotorischer Symptome ein seit 1972 häufig eingesetztes Medikament. Aufgrund von bis zu 50 % letal verlaufenden Agranulozytosen unter Clozapin-Therapie, die in Finnland geradezu endemischen Charakter annahmen (15), wird dieses trizyklische Neuroleptikum nur noch unter strengsten Kautelen eingesetzt und ist seit Beginn 1978 in der Bundesrepublik nur noch in Fachkliniken zugelassen, obwohl die Inzidenz der sogenannten Clozapin-Agranulozytosen mit 0,1.3 bzw. 0,1.7 % nicht

merklich über der sogenannten Phenothiazin-Agranulozytose-Inzidenz (0,1 %) liegt (1,35). Im Gegensatz dazu zeigen Butyrophenone nicht die beschriebenen Nebenwirkungen auf das hämatopoetische System, obwohl sie sonst in Indikation und Wirkung nahezu identisch sind.

Hinweise für eine primäre Wirkung von Neuroleptika auf das Immunsystem ergaben sich aus der Beobachtung, daß unter Chlorpromazin-Therapie die Serum-IGG-Konzentrationen bei schizophrenen Patienten initial abfielen, nach länger dauernder Therapie jedoch wieder normal wurden (32).

In einer Untersuchung von Özek et al. (44) wurden drei Versuchsgruppen (1.: Patienten mit akuten und subakuten Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis unter Neuroleptikatherapie, 2.: Patienten mit schizophrenen End- und Defektzuständen ohne Therapie und 3.: gesunde Versuchspersonen) mit Salmonellen-Antigen immunisiert und die humorale Immun-Antwort in wöchentlichen Antikörper-Titerbestimmungen verfolgt. Es zeigte sich, daß Patienten unter Neuroleptika-Therapie genauso gut wie die gesunde Kontrollgruppe, am Ende der Untersuchung sogar besser reagierten. Die chronisch schizophrenen Patienten zeigten einen verlangsamten und insgesamt verminderten Anstieg. Özek et al. folgerten daraus, daß Neuroleptikagaben zu einer humoralen Immunstimulation führen können.

1.2 Das in-vitro Modell der zellulären Immunreaktion

Es ist hinlänglich bekannt, daß ein spezifischer Antikörpernachweis und die quantitative Titration eine Aussage über das Funktionieren des humoralen Immunsystems erlauben.

Zur Prüfung der zellulären Immun-Antwort laufen seit den frühen sechziger Jahren Untersuchungen, die insgesamt auf der Beobachtung der in-vitro Reaktion von primär aus dem peripheren Blut gewonnenen Lymphozyten des Menschen beruhen. Nowell (43) beobachtete im Jahre 1960, daß Phytohämagglutinin (PHA), ein alkoholischer Extrakt aus der gewöhnlichen roten Schminckbohne, Blutlymphozyten in der Gewebekultur zu einer Serie von morphologischen Veränderungen bis

hin zur Blastentransformation aktivieren kann. Bis dahin hatte man Blutlymphozyten für kurzlebig und wenig biologisch aktiv gehalten. Man erkannte sehr bald die enge Beziehung dieser in-vitro Reaktion auf PHA zur in-vivo allergischen Reaktion vom Tuberkulintyp (46), was nachfolgend zu der Entdeckung einer Reihe von extrazellulären Faktoren führte, die die humorale und die zelluläre Immun-Antwort in-vivo regulieren bzw. steuern. So wurden Leukozyten-migrations-hemmende Faktoren, lymphozytotoxische Faktoren, chemotaktische und blastogene Faktoren, sowie der bis heute am intensivsten untersuchte Leukozyten-Transferfaktor nachgewiesen (11,37).

In der experimentellen und klinischen Immunologie sind in-vitro Untersuchungen an aus dem peripheren Blut gewonnenen Lymphozyten Legion und man kann mit Fug und Recht vom Lymphozyten als dem E. coli der Immunologie sprechen (27). Methodische Verbesserungen wie die Entwicklung praktikabler Separationstechniken von Lymphozyten aus dem Vollblut (12), die Möglichkeit, Lymphozyten ohne signifikanten Vitalitätsverlust cryokonserviert aufzubewahren (9, 20, 36, 60, 62), die Entwicklung von Mikrokulturmethoden (31) und die Quantifizierung der Lymphozytentransformation und mitotischen Aktivität durch radioaktive Markierung mit DNS-Vorläufern (3) haben es ermöglicht, daß klinische Fragestellungen der zellulären in-vitro Immunantwort am Patienten untersucht werden können.

1.3 Medikamente und Lymphozytentransformation

Neben der klinischen Diagnostik von hereditären und erworbenen zellulären Immundefektsyndromen (5) oder der Biochemie des Zellzyklus (47) wurden und werden die Einflüsse von Medikamenten auf das zelluläre Immunsystem anhand des in-vitro Stimulationsverhaltens von Lymphozyten untersucht: Nach in-vivo Gabe von Dexamethason oder Aspirin an Freiwillige sowie bei Frauen unter kontrazeptiver Therapie, sowie bei Schwangeren fand man eine signifikante Erniedrigung der Lymphozytentransformation auf PHA-Stimulation in-vitro (6, 17, 22, 52). Eskola et al. beschreiben einen biphasischen circadianen Rhythmus der PHA-induzierten Lymphozytenreaktion, der reziprok zum Plasmacortisolspiegel verläuft (21). Im Gegensatz dazu beobachtete Tavadia et al. einen synchron zum Cortisolspiegel verlaufenden Rhythmus der PHA-Antwort (21, 59).

Ein anderer Ansatzpunkt, die Wirkung von Medikamenten auf das zelluläre Immunsystem zu prüfen, ist die in-vitro Lymphozytenstimulation in Gegenwart des zu untersuchenden Medikamentes. Antiinflammatorische Substanzen, wie Salicylsäure (25), Acetylsalicylsäure (45), das Antirheumatikum Chloroquin (34), sowie das Antiepileptikum Diphenylhydantoin (40) und das Anaesthetikum Halothan (13,18) brachten in dem genannten Versuchsansatz eine signifikante Hemmung der PHA-induzierten Lymphozytentransformation.

1.4 Direkte Wirkungen von Neuroleptika in der Lymphozytenkultur

Untersuchungen über den Einfluß von Neuroleptikagabe in-vivo auf die Lymphozytenreagibilität in-vitro liegen in publizierter Form bisher nicht vor. Mehrere Arbeiten liegen vor, die sich mit der Hemmung der PHA-induzierten Lymphozytentransformation durch direkte Zugabe der psychotropen Substanzen in-vitro befassen:

Tsancheva (61) fand nach Zugabe von Haloperidol bzw. Thioperazin zur Lymphozytenkultur gesunder Probanden eine signifikante Hemmung der Blastentransformation und der nachfolgenden Mitose, jedoch keine mutagenen Auswirkungen. Garry und Uyeki (26) beobachteten einen supprimierenden Effekt von Chlorpromazin, Promazin und Triflupromazin auf die B-Lymphozyten abhängige Antikörperproduktion in-vitro im sogenannten Plaque-Assay. Für Chlorpromazin fanden Ferguson et al. (23) ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Lymphozytentransformation, wobei der Hemmeffekt streng konzentrationsabhängig war.

Erste Hinweise auf den Wirkmechanismus der Neuroleptika-induzierten in-vitro Suppression der Lymphozytenfunktion finden sich bei Baker et al. (4): Phenothiazine und Nichtphenothiazine hemmen dosisabhängig bei nahezu identischer molekularer Konzentration die RNS-Synthese. Die Autoren schlossen aus dieser Beobachtung, daß die untersuchten psychotropen Pharmaka einen gemeinsamen Rezeptor im RNS-Synthesystem haben müßten. Die ebenfalls untersuchte DNS-Synthese wurde erst ab einer bestimmten Schwellendosis gehemmt.

Pisciotta (49,50) analysierte die Krankheitsverläufe von insgesamt 46 Patienten mit sogenannter Phenothiazin-Agranulozytose und kommt zu dem Schluß, daß hier ein geringeres Proliferationspotential der Knochenmarksstammzellen im Vergleich zur gesunden Kontrollpopulation vorliegt. Mit Hilfe des H^3 -Thymidin-Einbautestes in die Knochenmark-Zellkultur stellte er fest, daß Chlorpromazin-sensitive Patienten eine geringere Proliferationsrate als gesunde Vergleichspersonen aufweisen. Ein Zusatz von Chlorpromazin zur in-vitro Kultur führte bei diesen Patienten zu einer völligen Hemmung der Zellteilung, während die Knochenmarkszellen von Personen der Vergleichsgruppe nur geringfügig in ihrer Proliferation gehemmt wurden.

2. Ziel und Aufbau der Untersuchungen

Die vorliegenden Untersuchungen zielten darauf ab, die Einflüsse verschiedener Neuroleptika bei der Anwendung am Patienten auf das zelluläre Immunsystem aufzuzeigen. Dabei waren sowohl Kurz- als auch Langzeitwirkungen von Interesse.

Akut schizophrene Patienten, die zumindest vier Wochen vor der stationären Aufnahme ohne Medikamente gewesen waren, wurden in die Studie aufgenommen und unmittelbar vor der beabsichtigten Therapie mit neuroleptischen Pharmaka, 48 Stunden danach und 20 Tage nach Therapiebeginn im Lymphozytentransformationstest untersucht. In die Studie aufgenommen wurden Patienten beiderlei Geschlechts vom sechzehnten bis zum sechzigsten Lebensjahr. Nach Möglichkeit erhielten die Patienten keine zusätzlichen Medikamente mit Ausnahme des Schlafmittels Chloralhydrat. Auswahl und Dosierung des jeweiligen Neuroleptikums lag im Ermessen des behandelnden Arztes. Patienten, die frühzeitig wieder entlassen wurden oder bei denen die Neuroleptikamedikation nicht mehr erforderlich war oder eine massive zusätzliche Therapie (zB. Antibiotika oder Antidepressiva) notwendig wurde, wurden wieder aus der Studie herausgenommen. Wegen dieser Auswahlkriterien war von vornherein klar, daß für diese Studie nur eine vergleichsweise geringe Patientenzahl erreicht werden konnte. Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungen als Verlaufsstudie konzipiert, das heißt, es wurden nicht Gruppen miteinander verglichen, sondern der Verlauf der zellulären Immunreaktion über einen Zeitraum von 20 Tagen unter der entsprechenden Neuroleptikamedikation. Individuen mit insgesamt verminderter Immun-Antwort in-vitro werden somit im longitudinalen Verlauf mit Individuen mit höheren Ausgangswerten vergleichbar.

Zur Abschätzung der Test-immanenten Streubreite im longitudinalen Beobachtungsverlauf wurde an 11 freiwilligen gesunden Probanden ohne Neuroleptikamedikation an einem fiktiven Tag Null, nach 48 Stunden und nach zwanzig Tagen ein Lymphozytentransformationstest durchgeführt.

3. Methoden

3.1 Lymphozytenisolierung und Cryokonservierung

An jedem Untersuchungstermin wurden 20 ml steriles, heparinisiertes (50 IE pro ml) Blut durch Venenpunktion gewonnen. Als Antikoagulant wurde ein stabilisatorfreies Heparin (Heparin Novo Industries GmbH, 5000 IE Heparin pro ml) verwandt, da die üblichen Heparinzubereitungen Stabilisatoren wie zB. 0,15 % Chlorocresol enthalten, die toxisch auf die Lymphozyten wirken können (38). Nachdem es sich bei dem Lymphozytentransformationstest um eine über 72 Stunden laufende Zellkultur handelt, wurden alle Substanzen und Geräte, die mit den zu testenden Blutproben in Kontakt kamen, durch Membranfiltration bzw. Hitzesterilisation keimfrei gemacht.

Die Lymphozyten wurden aus dem Gesamtblut nach der Methode von Boyüm (12) separiert, die geringfügig modifiziert wurde: Für jeweils 20 ml heparinisiertes Blut wurden zwei silikonisierte 25-ml-Glaszentrifugengläser mit zehn Milliliter Lymphozytentrennmedium (Ficoll-Isopaque, spezifische Dichte bei 20 Grad Celsius 1,077) vorbereitet. Das Heparinblut wurde dann direkt aus der Einmalspritze mit aufgesetzter Kanüle vorsichtig über das Trennmedium geschichtet. Die anschließende Zentrifugation bei 1300 g für 18 Minuten führt zu einer Anreicherung der mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) in der sogenannten Inter-Phase zwischen Ficoll-Isopaque-Gradient und der darüberliegenden Blutplasmaschicht. Diese Interphase ist als weißlicher Ring zu erkennen und wird mit einer Pasteurpipette abgehoben und anschließend mit Zellkulturmedium (RPMI 1640, gepuffert mit 20 mMol HEPES und angereichert mit 0,5 % Gentamycin und 1 % L-Glutamin) zweimal gewaschen. Die Zellkonzentration der so gewonnenen Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop bestimmt und durch Zugabe bzw. Abnahme von Zellkulturmedium auf die Konzentration 1×10^7 mononukleäre Zellen pro ml eingestellt. Die durchschnittliche Zellausbeute je Separationsvorgang von 20 ml Heparinblut betrug $21,0 \times 10^6 \pm 7,3 \times 10^6$ (S.E.).

Bei 12 Patienten wurde bei der ersten Blutentnahme parallel ein Differentialblutbild im Routinelabor durchgeführt, so daß aus der

individuellen Gesamtleukozytenzahl pro Kubikmillimeter und dem prozentualen Anteil an mononukleären Zellen die Gesamtzahl an in der jeweiligen Blutprobe von zwanzig ml vorhandenen mononukleären Zellen berechnet werden konnte. Diese Ausgangszahl wurde in Beziehung gesetzt zur tatsächlichen Zellausbeute nach Ficollgradiententrennung. Es ergab sich eine Ausbeute von $40,1 \% \pm 14,8 \%$ (S.E.).

Da sich die Kollektivierung der einzelnen Blutproben über fast ein Jahr erstreckte, war es nicht möglich bzw. wäre es sehr aufwendig gewesen, jede einzelne Probe sofort in einem Lymphozytentransformationstest zu untersuchen. Aus diesem Grunde wurden die einzelnen Zellsuspensionen biologisch cryokonserviert. Hinzu kommt, daß die Cryokonservierung von mononukleären Zellen eine heute gängige Methode ist, die gewährleistet, daß die eingefrorenen und anschließend wieder aufgetauten Zellen mit einem hohen Vitalitätsgrad erhalten werden (9,20,60). Die Annahme, daß durch den Gefriervorgang eine Selektion bestimmter Lymphozytenpopulationen eintritt, scheint widerlegt zu sein (36). Die als Kontrollgruppe untersuchten Zellsuspensionen von Normalpersonen wurden ebenfalls cryokonserviert. Somit wäre ein Einfluß der Cryokonservierung -falls doch vorhanden- also ein systematischer Fehler, der die longitudinale Studie nicht grundsätzlich beeinflussen sollte.

Zur Vorbereitung der Cryokonservierung wurden die auf 1×10^7 pro Milliliter konzentrierten Zellsuspensionen zunächst auf 4° Celsius abgekühlt. Parallel dazu wurde ein sogenanntes Gefriermedium bestehend aus 60 % Zellkulturmedium, 20 % inaktiviertem AB-Serum und 20 % DMSO (Dimethylsulfoxid, SERVA) erstellt, das ebenfalls auf 4° Celsius gekühlt wurde. Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden nun im Volumenverhältnis 1:1 tropfenweise unter Schütteln gemischt, so daß eine Endkonzentration von 5×10^6 Zellen pro ml und zehn Prozent DMSO bzw. AB-Serum resultierte. Diese DMSO-Konzentration wurde von Weiner (62) als für die biologische Cryokonservierung von humanen Zellen optimale Zubereitung angegeben.

Die weiterhin auf 4° Celsius gehaltenen Zellsuspensionen wurden nun in Cryokonservier-Ampullen (2-ml-Plastikampullen der Firma NUNC) abgefüllt und anschließend in ein automatisch gesteuertes Gefriergerät gegeben, das mit einer Temperaturerniedrigung von einem Grad

pro Minute diese Ampullen auf minus 60° Celsius und dann mit einer Gefriertrate von fünf Grad pro Minute auf minus 180° abkühlt. Die Kühlbox dieses Cryokonserviergerätes (CRF-2 der Firma Union Carbide) wird mit Hilfe von stoßweise in den Gefrierraum gesprühtem flüssigem Stickstoff definiert abgekühlt. Nach Beendigung des Cryokonservierungsvorganges wurden die Ampullen unter flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

3.2 Lymphozytentransformationstest in-vitro

Erst nachdem die Kollektivierung der einzelnen Blutproben abgeschlossen war, wurde mit der Durchführung des eigentlichen Lymphozytentransformationstestes begonnen. Aus arbeitstechnischen Gründen konnten pro Tag maximal die jeweiligen drei Proben (Tag 0, Tag 3, Tag 20) von vier Versuchspersonen untersucht werden.

Zur Testung wurden die entsprechenden Gefrierampullen dem flüssigen Stickstoff entnommen und direkt in auf 38° Celsius erwärmtes Leitungswasser gegeben. Unter ständigem Bewegen der aufzutauenden Gefrierampullen wurde darauf geachtet, daß diese nur bis zu dem Punkt im Wasser verblieben, bis das letzte makroskopisch sichtbare Eis geschmolzen war. Da DMSO bei Temperaturen über 4° Celsius zelltoxisch wirkt, wurden die aufgetauten Gefrierampullen rasch aufgeschraubt und der Inhalt in auf einer Kühlplatte bei 4° Celsius gehaltene silikonisierte Glaszentrifugengläser pipettiert. Das Auswaschen von DMSO geschah im ersten Schritt durch Zugabe von 4° Celsius kaltem AB-Serum im Volumenverhältnis 1:1. Anschließend wurde im Volumenverhältnis von etwa 1:10 Zellkulturmedium hinzugegeben, was zu einer Endkonzentration von etwa 1 % DMSO führte. Diese DMSO-Konzentration ist nicht mehr zelltoxisch. Die so aufgetauten Zellen wurden einmal mit Zellkulturmedium gewaschen und auf die Konzentration $6,6 \times 10^6$ pro Milliliter eingestellt. Die Prüfung der Vitalität geschah durch die Trypanblaufärbung.

Aus der Differenz zwischen der Anzahl der an dem Cryokonservierungsvorgang beteiligten Lymphozyten und der nach dem Auftauen wieder erhaltenen Lymphozyten läßt sich die sogenannte Wiederauffindungsrate berechnen ("recovery-Rate"): Sie betrug bei den hier durchgeführten Untersuchungen $88 \% \pm 5,3 \%$ (S.E.). Die Vitalitätsprüfung

ergab nie mehr als 4 % Trypanblau-positive Lymphozyten, das heißt: 96 % der cryokonservierten Zellen waren nach dem Auftauvorgang vital. Vergleichbare Cryokonservierungsuntersuchungen hat Weiner (62) publiziert: Er kommt zu einer recovery-Rate von 87 % und zu einer Vitalitätsrate von 90 %.

Der sich nun anschließende Lymphozytentransformationstest wurde in der sogenannten Mikrokulturmethode durchgeführt, deren Prinzip erstmals von Hartzmann et al. (31) beschrieben wurde. Als Kulturgefäße dienten sogenannte Mikrotiter-Platten (System COOKE der Firma NUNC), die für den Zellkulturgebrauch in einem speziellen Verfahren oberflächenbehandelt worden waren, was zu einer besseren Benetzbarkeit der Plastikoberfläche führte. Von jeder Zellprobe wurde eine Sponsankultur zur Messung der unspezifischen Proliferationsaktivität sowie je eine Kultur von fünf Mitogenen in jeweils zwei Konzentrationen angelegt, wobei jede einzelne Kultur in einem Vierfachansatz durchgeführt wurde. Es ergab sich somit pro Zellprobe eine Zahl von 44 Mikrokulturen. Die einzelnen Mitogene wurden nach folgendem Schema in die Vertiefungen der Mikrotiter-Platten eingebracht:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Spontanwert				PHA	0,2 MCG				PHA	0,4 MCG	
B	CON A 2,0 MCG				CON A	3,0 MCG				PWM	0,5 MCG	
C	PWM	1,0 MCG				ATG	1:16				ATG	1:32
D	STE	0,01 MCG				STE	0,02 MCG				-----	
E	Spontanwert				PHA	0,2 MCG				PHA	0,4 MCG	
F	CON A 2,0 MCG				CON A	3,0 MCG				PWM	0,5 MCG	
G	PWM	1,0 MCG				ATG	1:16				ATG	1:32
H	STE	0,01 MCG				STE	0,02 MCG				-----	

Folgende Mitogene wurden im Lymphozytentransformationstest eingesetzt:

1. Phytohämagglutinin (WELCOME)
2. Concanavalin A (SIGMA)
3. Pokeweed Mitogen (Institut Biologique Français)
4. Antithymozytenglobulin
5. Staphylokokkenenterotoxin (SERVA)

Das Antithymozytenglobulin wurde freundlicherweise von Herrn Privat-

dozent Dr. Rodt / Institut für Hämatologie, Abteilung Immunologie der GSF München / zur Verfügung gestellt, von dem in Vorversuchen gezeigt werden konnte, daß es eine mitogene Aktivität besaß. Es handelt sich hierbei um einen Antikörper, der durch Immunisierung von Kaninchen gegen humane Thymuszellen erzeugt wurde (53).

Die einzelnen in lyophilisierter Form von den Lieferfirmen erhaltenen Mitogene wurden mit PBS (phosphate buffered saline) aufgelöst und durch Membranfiltration sterilisiert. Mit einem modifizierten Hamilton-Dispensor, in den sich eine Einmilliliter-Plastiktuberkulinspritze einsetzen lies, wurde dann entsprechend dem obigen Schema eine ausreichende Menge an Mikrotiter-Platten mit den einzelnen Mitogenlösungen in einem Volumen von 15 Mikroliter pro Vertiefung beschickt. Die so beschickten Platten wurden mit einer sterilen, nicht toxischen Adhäsivfolie verschlossen, diese Folie mit einem 96-fachen Perforator (FLOW) über jeder Kulturvertiefung wieder durchlöchert und anschließend mit einem sterilen Deckel versehen. Nach Vorgefrieren bei minus 20° Celsius wurde der Inhalt der Mikrotiter-Platten lyophilisiert (Lyophilisator freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Hochstein-Mintzel / staatl. Landesimpfanstalt München). Nach Beendigung der Lyophilisation wurde die Kammer mit Argon belüftet, um einen Zutritt von Luftfeuchtigkeit zu vermeiden. Anschließend wurden die nunmehr Mitogen-Platten genannten Kulturgefäße in sterile, feuchtigkeitsundurchlässige Plastikbeutel eingeschweißt und bei 4° Celsius bis zum Verbrauch gelagert.

Das Ziel dieses doch relativ aufwendigen Lyophilisationsverfahren war der Wunsch eine möglichst gleichmäßige Charge an Mitogen-Platten zu erhalten, um methodische Varianzen im Lymphozytentransformationstest zu minimalisieren.

Zur Stimulation der Lymphozytenproben mit den einzelnen Mitogenen wurden zunächst mit Hilfe eines Hamilton-Dispensors, in den eine 10-ml-Plastikeinmalspritze gespannt wurde, pro Vertiefung 150 Mikroliter Zellkulturmedium (RPMI 1640, gepuffert mit NaHCO_3 , angereichert mit 1 % L-Glutamin, 0,5 % Gentamycin und 10 % inaktiviertem AB-Serum) pipettiert. Anschließend wurden in einem Volumen von 15 Mikroliter die entsprechenden Lymphozytensuspensionen (Zellkon-

zentration $6,6 \times 10^6$ pro ml) in die Vertiefungen pipettiert, was zu einer Lymphozytenzahl von 1×10^5 pro Vertiefung führte. Die so beschickten Mikrotiter-Platten wurden mit einem sterilen Plastikdeckel versehen und zur Vermeidung von bakteriellen und Pilzkontaminationen in eine sterile, CO_2 -durchlässige Plastiktüte gegeben. Die Inkubationsbedingungen waren 38° Celsius, 5 prozentige CO_2 -Athmosphäre und gesättigte Luftfeuchtigkeit.

3.3 Aufarbeitung und Quantifizierung der Lymphozytentransformation

72 Stunden nach Inkubationsbeginn wurden die Kulturplatten mit 1,5 MikroCurie H^3 -Thymidin pro Vertiefung markiert (spezifische Aktivität: 5 Curie pro mMol, Amersham-Buchler). Nach weiteren 16 Stunden Inkubation wurden die Zellkulturen durch Zentrifugation bei 600 g für 10 Minuten und Absaugen des überstehenden Zellkulturmedium gestoppt und bei minus 20° Celsius aufbewahrt.

Zur Messung der H^3 -Thymidineinbaurate in die DNS wurden die Platten aufgetaut und jeder einzelne Kulturansatz mit Hilfe eines Erntegerätes (Semiautomatic multiple sample precipitator, O.Hiller, Madison) auf Glasfaserfilterstreifen (Schleicher & Schüll) gesaugt (30). Nach Trocknung der Glasfaserfilterstreifen auf einer Heizplatte wurden diese in je 12 Einzelstücke zerschnitten, die den jeweiligen Vertiefungen einer Kulturreihe der Mikrotiter-Platten entsprachen, und einzeln in Plastik-Scintillationsröhrchen gegeben. Der Tritiumgehalt der einzelnen Proben wurde in einem Packard Tricarb 2440 bestimmt und die Messergebnisse auf einem Teletype-Schreiber "on-line" sowohl im Ausdruck als auch auf Lochstreifen dokumentiert.

Da von jedem Stimulationsversuch vier Einzelwerte vorlagen, die aufgrund von unvermeidlichen Messprozeßfehlern, wie zum Beispiel die Statistik des radioaktiven Zerfalls, des Energietransfers (7) und aufgrund von Ungenauigkeiten in der Methodik des Lymphozytentransformationstestes eine Streubreite aufweisen, wurde der Mittelwert dieser vier Einzelwerte berechnet. Von Herrn Dipl. Phys. W.Ruppelt / Institut für Hämatologie / war zu diesem Zweck ein Programm erstellt worden, das die auf Lochstreifen abgespeicherten Vierfachwert mittelte und Ausreißer, das heißt: Einzelmessungen, die außerhalb des 2-s-Bereiches lagen, eliminierte (54).

Nachdem nur die spezifische in-vitro Antwort auf die eingesetzten Mitogene von Belang war, wurden die Spontaneinbauraten von den jeweiligen Mitogen-Stimulationsraten subtrahiert. Auch dieser Rechengang wurde durch ein Computerprogramm vollzogen.

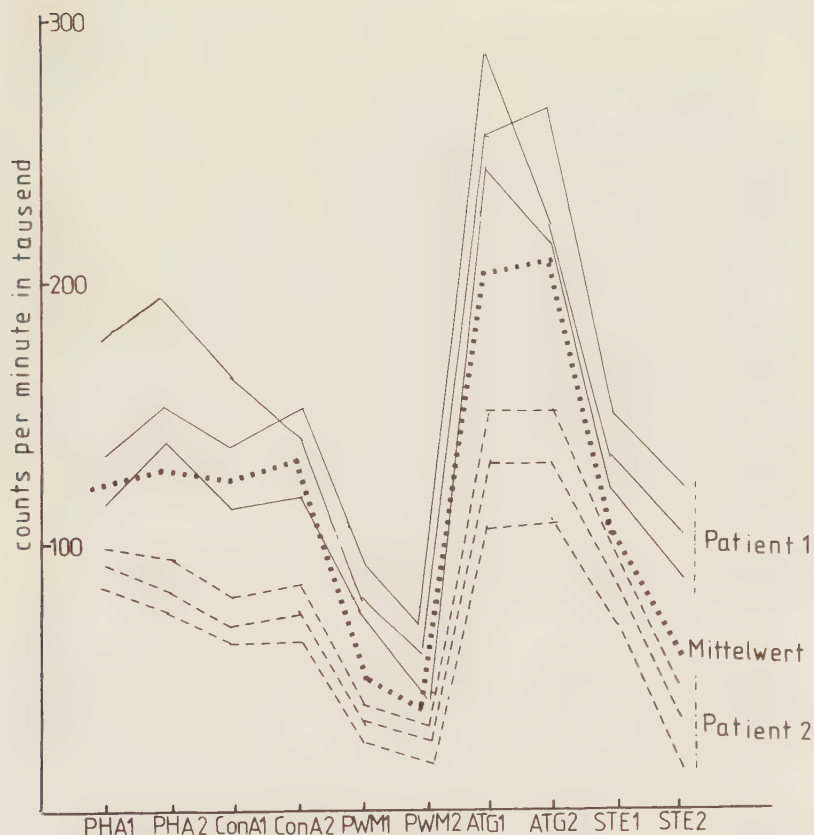


Abbildung 1:

^3H -Thymidin-Einbauraten in counts per minute bei je drei Zellproben zweier Patienten in Abhängigkeit von der Stimulation mit fünf Mitogenen, die in zwei verschiedenen Konzentrationen eingebracht wurden. Dicke Linie; Mittlere Transformationspotenz der Mitogene in allen Versuchen.

4. Ergebnisse

4.1 Durchschnittliche Mitogen-Stimulationsraten

Betrachtet man die sowohl bei den Patienten als auch bei den Normalpersonen erhaltenen Stimulationswerte auf die eingesetzten Mitogene, so zeigt sich (Abbildung 1), daß die höchsten DNS-Einbauraten mit dem Mitogen Antithymozytenglobulin (ATG) erzielt wurden. Bei diesem ATG handelt es sich um ein heterologes im Kaninchen erzeugtes Antiserum gegen humane Thymuszellen. In der Komplementbindungsreaktion ergeben sich gleichermaßen hohe Titer gegen T- wie B-Lymphozyten (Durchführung Priv. Doz. Dr. Rodt / Institut für Hämatologie der GSF München), so daß geschlossen werden kann, daß die mitogene Aktivität dieses ATG sowohl gegen die T- wie auch gegen die B-Lymphozytenreihe gerichtet ist.

Die Mitogene PHA und Con A zeigen ihre Stimulationsmaxima nach etwa 3 Tagen (39,41) und führen primär zur Proliferation von T-Lymphozyten, wobei neuerdings Hinweise vorhanden sind, daß Con A primär die Suppressor T-Lymphozyten induziert (2,19,41,48). Wie in Abbildung 1 zu ersehen sind die durchschnittlichen Stimulationsraten für PHA und Con A in etwa gleich und rangieren zwischen den Raten von ATG einerseits und PWM und STE andererseits.

Das Pokeweed-Mitogen (PWM) und bakterielle Endotoxine werden heute als Überwiegend B-Lymphozyten-stimulierende Substanzen angesehen (28,58). Die radioaktiven Einbauraten nach PWM- und STE-Stimulation liegen deutlich unter denen von PHA und Con A, was als Hinweis dafür gewertet werden kann, daß im peripheren Blut die T-Lymphozyten mit einem prozentualen Anteil von 70 % gegenüber den B-Lymphozyten mit einem prozentualen Anteil von 20 % überwiegen!

Hinsichtlich der optimalen Mitogenkonzentration für das Erreichen maximaler in-vitro Stimulationswerte ist bekannt, daß diese nicht für jedes Individuum identisch ist (38). Das war der Grund dafür, warum alle Mitogene in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurden, um einen größeren Bereich abzudecken.

Abbildung 1 zeigt neben den mittleren Mitogen-Stimulationsraten

exemplarisch die Ergebnisse der Testung von zwei Patienten mit ihren jeweiligen 3 Untersuchungsproben (Tag 0, Tag 3, Tag 20). Beim Patienten 2 mit einer insgesamt verminderten in-vitro Reagibilität zeigen die drei Untersuchungsproben eine strenge Parallelität in ihren DNS-Einbauraten. Obwohl in den Absolutwerten verschieden haben sie doch für alle Mitogene und deren Konzentrationen eine gleiche Rangfolge. Bei Patient 1, der ein höheres Stimulationsniveau erreicht, gilt diese strenge Parallelität nicht: Einmal erbringt ATG in der Verdünnung 1:32 die Maximalstimulation, zweimal aber ATG in der Verdünnung 1:16. Diese exemplarische Darstellung soll zeigen, daß aufgrund der individuell unterschiedlichen in-vitro Reagibilität die absoluten H^3 -Thymidineinbauraten der einzelnen Personen große Unterschiede aufweisen, so daß die errechneten Mittelwerte für die stimulative Potenz der einzelnen Mitogene die wirklichen Verhältnisse nur unzureichend wiedergeben, daß jedoch die Rangfolge, das heißt das Verhältnis der Stimulationsrate eines einzelnen Mitogens zu denen der übrigen, gut in der Reihenfolge der gemittelten Werte zum Ausdruck kam.

Um nachzuweisen, ob diese Behauptung auf alle erhaltenen Lymphozytenkulturen zutrifft, wurde eine statistische Analyse mit Hilfe des Friedmann-Testes, einer Rangvarianzanalyse für mehrere verbundene Stichproben, durchgeführt (55). Die Nullhypothese lautet: Die eingesetzten Mitogene haben keinen Einfluß auf die Verteilung der verschiedenen Messwerte. Die Alternativhypothese lautet: Die erhaltenen Messwerte einer Zellprobe reihen sich in Abhängigkeit von den verschiedenen Mitogenen auf. Die letztere Hypothese wurde auf dem 1 % - Niveau ($p = 0,01$) als hochsignifikant bestätigt.

Im anschließend durchgeführten Vergleich nach Wilcoxon und Wilcox (55) stellte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,01$) zwischen ATG als sowohl B- als auch T-Zellmitogen, PHA und Con A als primäre T-Zellmitogene und drittens PWM und STE als primären B-Zellmitogenen heraus. Signifikante Differenzen für die Konzentrationen eines einzelnen Mitogens waren nicht zu ermitteln, wie sich auch die T-Zellmitogene PHA und Con A sowie die B-Zellmitogene STE und PWM untereinander nicht unterschieden.

4.2 Medikamente und Patienten

Wie unter 2. dargelegt, wurden die in diese Studie eingegangenen Patienten vom jeweiligen behandelnden Arzt in der Klinik nach dessen klinischer Einschätzung behandelt. Ein Patient konnte nur dann in die Studie aufgenommen werden, wenn er anamnestisch in den letzten vier Wochen keine Medikamente zu sich genommen hatte, wenn voraus zu sehen war, daß eine Neuroleptikatherapie eingesetzt werden würde, und wenn keine Nebenmedikation zu erwarten war. Nach Abschluß der unter 3. beschriebenen Kollektivierung und Konservierung der Blutproben wurde in den Krankenjournalen diese Voraussetzung überprüft und zusätzlich Alter, exakte Diagnose und Medikamentendosierung festgehalten. Aus diesen Daten ergaben sich Gruppen von Patienten, die jeweils dasselbe Medikament erhalten hatten. Tabelle 1 zeigt die Medikamentengruppen, Zahl der zugehörigen Patienten, Durchschnittsalter und -dosierung bis zum 3. Tag und zum 20. Tag des stationären Aufenthaltes.

Insgesamt wurden 32 Patienten, die mit 5 verschiedenen Neuroleptika behandelt worden waren, in die Studie aufgenommen. Das Durchschnittsalter betrug 33 Jahre, wobei der älteste Patient 53 und der jüngste 20 Jahre alt war. Menschen im höheren Lebensalter haben gegenüber Jüngeren eine reduzierte in-vitro Reaktion im Lymphozytentransformationstest (29,51). Außerdem ist bei älteren Menschen die Gesamtlymphozytenzahl geringer, wobei sich insbesondere die T-Lymphozytenzahl vermindert, während die B-Lymphozytenzahl etwa gleich bleibt (16). In der vorliegenden Studie konnte kein Einfluß des Alters auf das Stimulationsniveau festgestellt werden, was sicherlich dadurch bedingt ist, daß extreme Altersunterschiede nicht vorkamen.

Die Tagesdosierungen der mit Benperidol behandelten Patienten bewegten sich im Bereich von 3 bis 12 Milligramm. Dieses Medikament ist das zur Zeit stärkste im Handel befindliche Neuroleptikum und wird zur antipsychotischen Behandlung besonders bei katatonen Symptomatik und zur Dämpfung psychomotorischer Erregungszustände eingesetzt. Es hat ausgeprägte extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen und kann zu hypotonen Zuständen führen. Langzeitbehandlung kann eine depressive Symptomatik hervorrufen und die Krampfbereitschaft erhöhen. In therapeutischer Dosierung werden bei Benperidol

Nebenwirkungen wie Leberschäden, Blutbildveränderungen oder Allergien kaum beobachtet. Benperidol wird üblicherweise nur bei stationärer Behandlung angewendet (8).

Aufgrund der Tatsache, daß die trizyklischen Neuroleptika Perazin, Laevomepromazin und Clozapin in ihrer Dosierung, ihrem Anwendungsspektrum und ihren Nebenwirkungen ziemlich ähnlich sind, wurde eine zweite Patientengruppe gebildet, die mit diesen Medikamenten behandelt worden war. Perazin ist ein Phenothiazin mit Piperazinyl-Seitenkette, Laevomepromazin ebenfalls ein Phenothiazin mit aliphatischer Seitenkette, während Clozapin nicht zu den Phenothiazinen zu rechnen ist, sondern ein eigenständiges trizyklisches Neuroleptikum darstellt. Alle drei Präparate zeichnen sich durch außerordentlich starke Nebenwirkungen aus: Sie haben eine anticholinergische Wirkung mit Hypotonie und orthostatischer Dysregulation, können Arzneimittlexantheme hervorrufen, können zu Pigmentationen am Herzmuskel und am Augenhintergrund führen, sowie zum cholestatischen Ikterus. Die endokrinen Wirkungen wie Cushing-ähnliche Syndrome, Gewichtszunahme, Menstruationsstörungen und Galactorrhöen bei Frauen sowie Libido- und Potenzstörungen bei Männern sind ein weiterer Hinweis auf die systemischen Wirkungen dieser Medikamente. Für die in dieser Arbeit angegangene Fragestellung wichtig sind vor allem die die medikamentenbedingten Blutbild-Veränderungen: Leukopenien bei einem Drittel der Patienten (49), jedoch zu Behandlungsbeginn auch Leukozytosen mit Linksverschiebung; passagere, mitunter excessive Eosinophilien in der zweiten bis vierten Behandlungswoche, denen häufig eine relative Monozytose folgt; relative Lymphozytosen bei Dauertherapie. Die schwerwiegendste Nebenwirkung ist sicherlich die Clozapin-induzierte Agranulozytose, die sich vor allem bei Frauen im mittleren und höheren Alter manifestiert und unter Umständen letal enden kann. Perazin und Laevomepromazin sind weniger häufig mit Nebenwirkungen dieser Art behaftet, haben aber dafür extrapyramidal-motorische Symptome, die Clozapin als einziges Neuroleptikum nicht aufweist (8).

Valproinsäure wird primär als Antiepileptikum beim Petit und Grand Mal eingesetzt. Eine mögliche neuroleptische Wirkung wird derzeit klinisch untersucht. Auch dieses Medikament ist nicht ohne Nebenwirkungen: So werden unter anderem Müdigkeit, gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit, Völlegefühl und Appetitschwankungen ange-

geben. Die bedrohlichste Nebenwirkung aber scheint die Beeinflussung des Blutgerinnungssystems mit Abfall der Thrombozytenzahl und Auftreten von Hämatomen darzustellen.

Tabelle 1 :

Die fünf verschiedenen getesteten Medikamente, ihre Handelsnamen, ihre neurologische Potenz im Vergleich zu Chlorpromazin, dessen neuroleptische Potenz gleich 1 festgelegt wurde, und die allgemein empfohlene Tagesdosis in Milligramm. Für Clozapin und Valproinsäure lagen keine Werte für die neuroleptische Potenz vor (8).

Des weiteren sind aufgeführt: Die Zahl der Patienten, die mit dem betreffenden Medikament behandelt wurden, aufgeschlüsselt in männlich (m) und weiblich (w), das Durchschnittsalter der Patienten mit Standardabweichung (s), die durchschnittliche Tagesdosierung bis Tag drei und Tag zwanzig in Milligramm und der Steubereich der Tagesdosis bei den einzelnen Patienten während der Medikation.

Medikament	Benperidol	Perazin	Laevomepromazin	Clozapin	Valproinsäure
Handelsname	Glianimon	Taxilan	Neurocil	Leponex	Convulex
neurolept. Potenz	mehr als 400 fach	1/3	2/3	-	-
empfohlene Tagesdosis	0,5-1,5 mg	65-600 mg	200-600 mg	200-300 mg	900-1800 mg
Zahl der Patienten	15 6m/9w	5 0m/5w	4 1m/3w	3 0m/3w	5 1m/4w
Alter der Patienten	30,5 J s 8,5	33 J s 6,6	33,5 J s 6,4	38,5 J s 5,4	29,5 J s 5,4
Tagesdosis bis Tag 3	6,3 mg s 2,8	293 mg s 57	113 mg s 17	153 mg s 51	991 mg s 104
Tagesdosis bis Tag 20	5,4 mg s 2,7	244 mg s 77	244 mg s 36	221 mg s 52	1480 mg s 153
Streubreich der Tagesdosis bis Tag 20	3-12 mg	178-365 mg	100-577 mg	125-382 mg	750-1920 mg

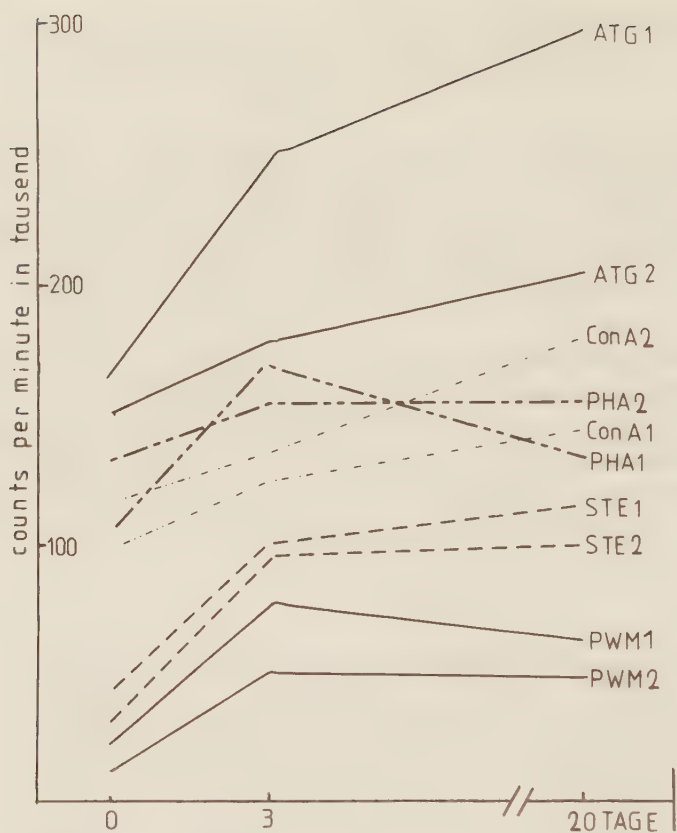


Abbildung 2:

Lymphozytentransformation - gemessen in counts per minute - durch Stimulation mit fünf Mitogenen in je zwei Konzentrationen an den Tagen null, drei und zwanzig einer Benperidoltherapie bei einem ausgewählten Patienten (durchschnittliche Dosis: 6,3 mg/die)

4.3 Longitudinal-Studie der Mitogen-Antwort

Die longitudinale Untersuchung der Lymphozytenreagibilität unter Neuroleptikamedikation war so angelegt, daß im Vergleich zum Ausgangswert bei der Untersuchung am 3. Tag der Therapie die akuten Wirkungen und am 20. Tag der Therapie die länger anhaltenden Einflüsse aufgezeigt werden. In Abbildung 2 ist beispielhaft der Verlauf dieses "Immunstatus" bei einem Patienten unter Benperidoltherapie dargestellt. Alle 10 Verlaufskurven (5 Mitogene mit jeweils 2 Konzentrationen) zeigen am dritten Behandlungstag einen Anstieg. Bis auf die Mitogen-Antwort auf PHA1 und PWM1 kommt es zu einem weiteren, jedoch geringeren Anstieg am Tag 20 der Therapie. Zur Interpretation dieser Longitudinal-Verläufe wurde das Rangzahlverfahren in folgendem Ansatz eingesetzt: Die maximale Mitogen-Antwort erhielt die Rangzahl 3, die mittlere die Zahl 2 und die niedrigste die Zahl 1. So findet man bei der in Abbildung 2 dargestellten Verlaufsuntersuchung achtmal den Verlauf 1-2-3, und zweimal den Verlauf 1-3-2.

Insgesamt sind sechs verschiedene Verlaufsformen möglich:

1-2-3 1-3-2 2-1-3 2-3-1 3-2-1 3-1-2.

Offensichtlich ist bei diesem Patienten die Tendenz 1-2-3 die vorherrschende. Zur Erhärtung dieser Annahme ist die Rangvarianzanalyse nach Friedman (55) für mehrere, verbundene Stichproben anzuwenden. Die Nullhypothese lautet, daß die Rangplätze der drei Bedingungen (Tag 0, 3, 20) zufällig verteilt sind. Falls aber diese drei Bedingungen einen Einfluß auf das Stimulationsniveau (das heißt: die zelluläre Reagibilität) haben, überschreitet die Prüfgröße χ^2 den kritischen Schwellenwert, wodurch die Alternativhypothese bestätigt wird. Für unser Beispiel war χ^2 gleich 16,8 und der kritische Schwellenwert für die 1 - % Irrtumswahrscheinlichkeit 9,6, das heißt, die Annahme, daß die Tendenz 1-2-3 die vorherrschende bei allen drei Kulturansätzen dieses Patienten war, war auf dem 1 - % Niveau signifikant.

Der Friedmanntest wurde in dieser Form bei allen 32 Patienten und den 11 Normalpersonen angewandt. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß bei 22 Patienten eine Signifikanz auf dem 1 % Niveau vorliegt. 27 Patienten hatten auf dem 5 % Niveau signifikante Verläufe. Bei 5

Tabelle 2 :

Der Zusammenhang zwischen dem Stimulationsniveau der Zellkulturen (Niveau definiert : hoch = PHA-Antwort größer 200×10^3 cpm (counts per minute), mittel = PHA-Antwort zwischen 200×10^3 cpm und 100×10^3 cpm, niedrig = PHA-Antwort kleiner 100×10^3 cpm) und der Häufigkeit von signifikanten Verlaufstendenzen für die drei Untersuchungstermine bezogen auf 10 unterschiedliche Kulturbedingungen. Bei hohem Stimulationsniveau gibt es häufiger nicht-signifikante Verläufe als bei mittlerem. Bei niedrigem Niveau sind alle Tendenzen statistisch signifikant.

Stimulationsniveau	Signifikanzniveau		keine	
	p = 0,01/p = 0,05		Signifikanz	gesamt
hoch (PHA > 200×10^3)	1	2	5	8
mittel (PHA > 100×10^3)	22	2	1	25
niedrig (PHA < 100×10^3)	9	1		10
Patienten gesamt	22	5	5	32
Normalpersonen	10		1	11
gesamt	32	5	6	43

Patienten war die Stimulationsreaktion in Bezug zu den drei Untersuchungstagen so inkonstant, daß die Tendenz unter dem Signifikanz-Niveau blieb. Eine mögliche Erklärung für diese Inkonstanz der einzelnen Mitogen-Antworten scheint in der Höhe des Stimulationsniveaus zu liegen. Es zeigte sich nämlich, daß nach Einteilung anhand der PHA-Stimulationsraten in hoch, mittel und niedrig reagierende Patienten fünf der hoch reagierenden Patienten keine Signifikanz erreichten, einer der 25 mittel reagierenden und keiner von den niedrig reagierenden Patienten nicht signifikante Tendenzen aufwiesen.

4.4 Bezug zwischen Neuroleptika und der Mitogen-Antwort

Die einzelnen Patienten sind bezüglich des Einflusses einer Neuroleptikamedikation auf die zelluläre Immunantwort nur dann vergleichbar, wenn die in-vitro Reaktion ihrer Lymphozyten gegenüber allen 10 Mitogenansätzen berücksichtigt wird. Bei der Betrachtung der in-vitro Reaktion auf ein einzelnes Mitogen bei einer bestimmten Konzentration ist die Möglichkeit eines zufälligen Abweichens sehr wahrscheinlich. Im Durchschnitt zeigten bei einer Versuchsperson 7,2 der Mitogenansätze den gleichen Verlauf, 2,8 wichen davon ab. In Tabelle 3 wurden deswegen nur die Personen berücksichtigt, bei denen sich für alle drei Untersuchungsproben bei allen Mitogenansätzen eine gemeinsame Rangtendenz ergab, die im Friedmantest mindestens auf dem 5 % Niveau signifikant war.

Von 27 untersuchten Patienten, die die Voraussetzung einer signifikanten gemeinsamen Rangtendenz für alle Mitogene erfüllten, hatten zwölf (44%) den Verlauf 1-2-3, das heißt, einen kontinuierlichen Anstieg der in-vitro Stimulationsraten. Zur statistischen Prüfung, ob diese Häufung zufällig ist oder eine spezifische Wirkung der Neuroleptikamedikation widerspiegelt, ist wiederum der Friedmantest die Methode der Wahl (55). Für eine auf dem 5 % Niveau signifikante Aussage ist ein χ^2 -Wert von 5,9 erforderlich. Der tatsächliche Wert lag bei 5,4. Somit ist die Häufung des 1-2-3 - Verlaufes der in- vitro Antwort als zufällig anzusehen.

Tabelle 3 :

Der Verlauf der in-vitro Immunantwort bei 27 schizophrenen Patienten während der Behandlung mit den Neuroleptika Benperidol, Valproinsäure, Perazin, Laevomepromazin und Clozapin an den Tagen null, drei und zwanzig der Medikation.

Die höchste in-vitro Reaktion erhielt die Rangzahl 3, die niedrigste die Rangzahl 1. Es wurden nur Patienten aufgeführt, deren Immunantwort nach Stimulation mit 5 Mitogenen á 2 Konzentrationen eine einheitliche Tendenz mit Signifikanz mindestens auf dem 5 % Niveau aufwies. Zur zusätzlichen Information werden die Reaktionsverläufe bei 10 Normalpersonen ohne Medikation vorgestellt.

	Rangverläufe mit $p = 0,05$ für alle Mitogenantworten						gesamt
	1-2-3	1-3-2	2-1-3	2-3-1	3-2-1	3-1-2	
Benperidol	5	2	1	2	1	2	13
Valproinsäure		1	1			2	3
Perazin	3				1		4
Laevomepromazin	2				1	1	4
Clozapin	2			1			3
alle Patienten	12	3	2	4	2	4	27
Normalpersonen	1	2	1	1	3	2	10
Summe	13	5	3	5	5	6	37

Beim Vergleich der zellulären in-vitro Reaktion vor Therapie mit dem Befund am dritten Tag unter Neuroleptikabehandlung ist bei 19 Patienten ein Anstieg der Mitogen-Antwort zu verzeichnen. Das sind die Verläufe 1-2-3, 1-3-2 und 2-3-1. Kurz nach Beginn der Neuroleptikatherapie zeigen somit etwa 70 % der Patienten einen Anstieg der Mitogen-induzierten Transformationsrate. Der Vergleich der Befunde vor Behandlung mit Tag 20 der Medikation zeigt bei 17 Patienten (62 %) einen Anstieg der Lymphozytenreaktion (Verläufe 1-2-3, 1-3-2 und 2-1-3). Es zeigt sich somit im Vergleich zu Tag drei eine Verringerung des Aufwärtstrends. Es bleibt jedoch festzuhalten, daß die Mehrzahl der Patienten (70 %) in den ersten drei Tagen der klinischen Behandlung mit Neuroleptika eine Erhöhung der in-vitro nachweisbaren zellulären Immunantwort gegenüber ihrer Ausgangslage erfahren. Dieser Trend verringert sich jedoch bis zum Tag 20 der Therapie. Die statistische Prüfung dieser Tendenz durch den multiplen Vergleich nach Wilcoxon und Wilcox (55) erbrachte jedoch keine signifikanten Ergebnisse. Obwohl mit der hier vorgestellten Methode kein vorhersagbarer Einfluß einer Neuroleptikamedikation auf das in-vitro prüfbare zelluläre Immunsystem festzustellen war, ist der Trend zu einer Erhöhung der zellulären Immunantwort unter Neuroleptikatherapie nicht zu übersehen, bedarf jedoch weiterer und hinsichtlich der Fallzahl größerer Studien.

Die Gruppe der untersuchten Normalpersonen zeigt, wie erwartet, keine Häufung der dargestellten sechs Verlaufsformen. Somit ist belegt, daß die angewandte Methodik der Cryokonservierung keinen entscheidenden Einfluß auf die bei den Patienten registrierten Verlaufsformen hat.

5. Diskussion

Ausgangspunkt für die hier vorgestellten Untersuchungen war die Frage, ob und in welchem Umfang die Gabe von Neuroleptika (Glimon, Taxilan, Neurocil, Laponex, Convulex) bei akut schizophrenen Patienten eine Veränderung der mit Hilfe des Lymphozytentransformationstestes erkennbaren zellulären Immunität zur Folge hat. Begründete Hinweise für den Einfluß von Neuroleptika auf die Immunantwort waren die Untersuchungen von Tsancheva (61) mit Haloperidol und Thioperazin, Garry und Uyeke (26) mit Promazin, Triflupromazin und Chlorpromazin und Ferguson et al. (23) mit Chlorpromazin, die allesamt zeigten, daß die in-vitro Zugabe dieser Medikamente im Lymphozytentransformationstest zu einer Hemmung der Reaktion führte. Vergleichbare in-vitro Studien sind bereits für folgende Medikamentengruppen bekannt: Salizylsäure (25), Acetylsalizylsäure (45), Cortikosteroide (10), Chloroquin (34), Phenylhydantoin (40) und Halothan (13,18), die ebenfalls zeigten, daß eine in-vitro Zugabe dieser Substanzen zu einer dosisabhängigen Lymphozytentransformationshemmung führt. Obwohl in allen diesen genannten Experimenten die jeweiligen Medikamente in einem Konzentrationsbereich eingesetzt wurden, der den Serumspiegeln bei der in-vivo Medikation äquivalent war, kann bezweifelt werden, ob diese in-vitro Ergebnisse dem in-vivo Geschehen gerecht werden. In-vivo applizierte Medikamente unterliegen nämlich zumeist einem Metabolismus, wobei oft erst die Abbauprodukte die Wirksubstanzen sind, und zum anderen aufgrund der Bindung an ein Trägerprotein der bestimmbare Serumspiegel des Medikamentes über dem pharmakologisch wirksamen liegt.

Zu dem Komplex der in-vitro Prüfung von Medikamenten auf eine mögliche immunstimulierende oder -hemmende Wirkung sei noch grundsätzlich angeführt, daß bei dem Versuchsansatz mit isolierten mononukleären Blutzellen (Lymphozyten und Monozyten) keine absolut physiologischen Bedingungen erreicht werden können, da in-vivo das zu untersuchende Medikament unter Umständen in einzelnen Organen bevorzugt gespeichert wird, und zum anderen neben den genannten Lymphozyten und Monozyten Zellen wie Granulozyten, Mastzellen und Zellen des retikuloendothelialen Systems entscheidend am immunologischen Geschehen im Organismus teilnehmen. Somit können in-vitro gemachte Beobachtungen nicht direkt auf die in-vivo Situation extrapoliert werden.

Für die humorale Immunität liegen in-vitro Untersuchungen (32) von Hippius, Kanig und Selbach vor, die zeigen, daß Neuroleptikagaben zu einem Anstieg der humoralen Immunität führen. In die gleiche Richtung weisen Immunisierungsversuche von Özek et al. (44) bei einer Gruppe von akut schizophrenen Patienten unter neuroleptischer Medikation und bei Normalpersonen, die mit Salmonellenantigen immunisiert wurden. Hier zeigte sich ein höherer Antikörperanstieg bei den neuroleptisch behandelten Patienten, was als Immunstimulation durch diese Pharmaka interpretiert wurde.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Mitogene zur Prüfung der zellulären Immunreaktion sind fast ausschließlich T-Lymphozyten-spezifische Aktivatoren (2,19,41,48). Das pflanzliche Lektin Pokeweed-Mitogen führt dagegen zur Blastentransformation und nachfolgender Proliferation von B-Lymphozyten, den Vorläuferzellen der Antikörper-produzierenden Plasmazellen (18,58), wobei einschränkend gesagt werden muß, daß diese PWM-induzierte B-Zellproliferation T-Lymphozyten abhängig ist, indem T-Lymphozyten über einen spezifischen Rezeptor PWM binden und nachfolgend über ein zweites Signal B-Lymphozyten zur Blastentransformation anregen.

Nachdem die Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferationen über den in-vitro Beobachtungszeitraum exponentiell verlaufen und diese Exponentialfunktion auch für die verwendete Proliferationsnachweisteknik, den H^3 -Thymidin-Einbaustest, gilt, erschien es wenig sinnvoll, die einzelnen Absolutwerte der radioaktiven Einbauraten für die einzelnen Mitogene zu mitteln und diese Mittelwerte von Tag 0, 3 und 20 unter Neuroleptikatherapie zu vergleichen. Es wurden vielmehr Rangfolgen des Verlaufes für jedes Mitogen ermittelt und mit der Rangvarianzanalyse nach Friedmann auf eine gemeinsame Richtung statistisch geprüft. Bei 27 der untersuchten 32 Patienten zeigten die 10 Mitogenansätze eine auf dem 5 % Niveau signifikante gemeinsame Rangtendenz. Die Mehrzahl dieser Patienten (70 %) wiesen am dritten Tag eine erhöhte zelluläre in vitro Immunantwort auf. Jedoch verringerte sich dieser Trend am zwanzigsten Therapietag, wo nur noch 26 % eine erhöhte Immunreagibilität gegenüber der Ausgangslage besaßen. Die statistische Prüfung dieser Tendenz durch den multiplen Vergleich nach Wilcoxon und Wilcox brachte jedoch kein signifikantes Ergebnis. Somit ist statistisch nicht belegt,

ob eine Neuroleptikatherapie einen vorhersagbaren Effekt auf die zelluläre Immunantwort in-vitro ausübt.

Es bleibt aber festzuhalten, daß ein Trend im Sinne einer Immunstimulation insbesondere am dritten Therapietag aufgezeigt werden konnte, der noch am zwanzigsten Tag -wenn auch vermindert- nachweisbar war. Nachdem der ursächliche Zusammenhang zwischen der Erhöhung der in-vitro Immunantwort und der Neuroleptikamedikation nicht bewiesen werden konnte, muß diskutiert werden, ob andere Faktoren eine Rolle gespielt haben. Denkbare Ursachen wären beispielsweise eine Hospitalisierungs-bedingte Umbesiedlung der Bakterienflora insbesondere des Darmes oder eine Verbesserung der Ernährungssituation der Patienten während der stationären Behandlung. Verfahrenstechnische Gründe scheiden aufgrund der Normalverteilung der Rangtendenzen der untersuchten Normalpersonen aus.

Neben der offensichtlichen Aussage, daß eine Neuroleptikamedikation in der hier beschriebenen Dosierung keine immunsuppressive Wirkung hat, sind endgültige Aussagen über eine immunstimulierende Wirkung von Neuroleptika erst nach umfangreicheren Studien möglich.

6. Zusammenfassung

Es wurde der Versuch unternommen, den möglichen Einfluß einer Neuroleptikamedikation unter klinischen Bedingungen auf das zelluläre Immunsystem mit Hilfe eines in-vitro Testes aufzudecken. Untersucht wurden die Medikamente Benperidol, Perazin, Laevomepromazin, Clozapin und Valproinsäure. Von 32 schizophren erkrankten Patienten, die zumindest 4 Wochen vor Aufnahme unbehandelt waren, wurden vor, drei Tage nach Beginn und zwanzig Tage nach Dauertherapie mit Neuroleptika Blutproben entnommen. Nach Trennung der Blutlymphozyten durch Gradientenzentrifugation wurden diese biologisch cryokonserviert und unter flüssigem Stickstoff gelagert. Nach Abschluß der Probenkollektivierung wurden die jeweiligen Lymphozytenproben eines Patienten unter exakt denselben Kulturbedingungen mit fünf Mitogenen (Phytohämagglutinin, Concanavalin A, Pokeweed-Mitogen, Antithymozytenglobulin, Staphylokokkenenterotoxin) in jeweils zwei Konzentrationen stimuliert. Die in den drei Lymphozytenproben erzielten H^3 -Thymidineinbauraten wurden für jedes Mitogen zueinander in Beziehung gesetzt und das Hauptverlaufsmuster eines jeden Patienten ermittelt.

Bei fünf Patienten differierten die einzelnen Mitogenverläufe so sehr, daß kein Hauptverlaufsmuster mit Hilfe des Friedmanntestes, einer Rangvarianzanalyse für unverbundene Stichproben, festgestellt werden konnte.

Bei den restlichen 27 Patienten zeigten die drei Lymphozytenproben für alle Mitogene gleichermaßen feststellbare Unterschiede der zellulären in-vitro Reaktion bezogen auf die Neuroleptikabehandlung. Bei 44 % dieser Patienten stieg die zelluläre Immunitätsreaktion an Tag drei und zwanzig kontinuierlich an, was in Rangzahlen ausgedrückt einem Verlauf 1-2-3 entspricht. Bei 70 % der Patienten lag am Tag 3 die in-vitro Reaktion über dem Ausgangswert, d.h. vor Beginn der Neuroleptikatherapie. Trotz des beobachteten Trends einer gesteigerten in-vitro Reagibilität in der frühen Behandlungsphase mit Neuroleptika konnte im Prüfungsverfahren nach Wilcoxon und Wilcox keine statistisch belegbare Signifikanz eines vorhersagbaren Einflusses im Sinne einer Immunstimulation durch in-vivo Gabe von Neuroleptika nachgewiesen werden.

7. Literatur

- 1 Andermann, B., Griffith, R.W.
Clozapine-induced agranulocytosis: A situation report up to august 1976.
Europ. Clin. Pharmacol., 11, 199 (1977)
- 2 Andersson, J., Möller, C., Sjöberg, O.
B lymphocytes can be stimulated by con a in the presence of humoral factors released by T cells.
Eur. J. Immunol. 2, 99 (1972)
- 3 Bain, B.
Tritiated-thymidine uptake in mixed lymphocyte cultures: Effect of specific activity and exposure time.
Science, 153 544 (1966)
- 4 Baker, G.A., Santala, R., Blumenstein, J.
Effect of psychotropic agents upon the blastogenic response of human T lymphocytes.
Biological Psychiatry, 12, 2 (1977)
- 5 Barandum, S., Büttler, R., Carmann, H., Cruchand, A., De Haller, R.
Klinisch immunologische Teste.
Schweiz. Med. Wschr., 103, 1195 (1973)
- 6 Barnes, E.W., MacGuish, A.C., London, N.B., Jordan, J., Irvine, W.
Phytohaemagglutinin-induced lymphocyte transformation and circulating antibodies in women taking oral-contraceptives.
The Lancet, 1, 898 (1974)
- 7 Bransome Jr. E.D.
The current status of liquid scintillation counting.
Grune and Stratton., New York and London (1970)
- 8 Benkert, O., Hippus, H.
Psychiatrische Pharmakotherapie.
Berlin. Heidelberg, New York (1974)
- 9 Bernhard, W.G., Echikson, J., Grubin, H., Zins, E.I.
Severe granulocytopenia in patient treated with chlorpromazine.
Amer. J. Clin. Path. 26, 388-390 (1956)

- 10 Blomgren, H.
Steroid sensitivity of the response of human lymphocytes to phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen: Role of phagocytic cells.
Scand. J. Immunol. 3, 655 (1974)
- 11 Bloom, B.R., Bennet, B.
Migration inhibitory factors associated with delayed type hypersensitivity.
Fed. Proc. 27, 13 (1968)
- 12 Boyum, A.
Separation of lymphocytes from blood and bone-marrow.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, 97 (1968)
- 13 Bruce, D.L.
Halothane inhibition of phytohaemagglutinin-induced transformation of human lymphocytes.
J. Anesthesiol. 36, 201 (1972)
- 14 Caspary, E.A., Hughes, D.
Liquid scintillation counting techniques in lymphocyte transformation in-vitro.
J. Immunol. Methods, 1, 263 (1972)
- 15 Chapelle, A., Kari, C., Nurminen, M., Hernberg, S.
Clozapine-induced agranulocytosis.
Hum. Gen. 37, 183 (1977)
- 16 Cohnen, G., Augener, W., Reuter, A., Brittinger, G.
Blood T and B lymphocytes in men in different age groups.
Z. Immunol. Forsch. 149, 463 (1975)
- 17 Crout, J.E., Hephurn, B., Ritts, R.E.
Suppression of lymphocyte transformation after ingestion of aspirin.
N. Engl. J. Med. 292, 221 (1975)
- 18 Cullen, B.F., Sample, W.F., Chretien, P.B.
The effect of halothane on phytohaemagglutinin-induced transformation of human lymphocytes in vitro.
J. Anesthesiol. 36, 201 (1972)
- 19 Dawkins, R., Zilko, P.
Separation of cells involved in phytohaemagglutinin-induced mitogenesis and cytotoxicity.
Nature, 254, 13 (1973)

- 20 Eijssvoegel, V.P., DuBois, M.J.G.I., Wal, R.v.d., Huismans, R.
Cryopreserved lymphocytes: Functional properties in vitro.
Transplant. Proc., 5: 415-420 (1973)
- 21 Eskola, J., Frey, H., Molnar, G., Sopri, E.
Biological rhythm of cell-mediated immunity in man.
Clin. Exp. Immunol. 26, 256 (1976)
- 22 Fauci, A.S.
Differential effects of in vivo hydrocortisone, prednisone and
dexamethasone on in vitro expression of lymphocyte function.
Clin. Exp. Immunol. 24, 54 (1976)
- 23 Ferguson, R.M., Schmittke, J.R., Simmons, R.L.
Effects of chlorpromazine and lidocaine in allogeneic mixed
lymphocyte culture.
Fed. Proc. 34, 1004 (1975)
- 24 Forsgren, A., Svedlund, S., Wigzell, H.
Lymphocyte stimulation by protein of staphylococcus aureus.
Eur. J. Immunol. 6, 207 (1976)
- 25 Gabourel, J.D., Davies, G.D., Rittenberg, M.B.
Effects of salicylate and phenobarbital on lymphocyte prolifera-
tion and function.
Clin. Immunol. Immunopathol. 7, 53 (1977)
- 26 Garry, V.F., Uyeki, E.M.
Effects of phenothiazines on the development of antibody-produ-
cing cells in vitro.
Biochem. Pharmacol. 21, 2801 (1972)
- 27 Glade, P. R.
Human lymphoid cells in continuous culture: The new E. coli.
New Scientist, 53 (1972)
- 28 Greaves, M., Janoussy, G.
Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell
surface binding ligands.
Transplant. Rev. 11, 87 (1972)
- 29 Hallgren, H., Bickley, C.E.
Lymphocyte haemagglutinin responsiveness, immunoglobulins and
autoantibody in aging humans.
J. Immunol. 111, 1101 (1973)

- 30 Harrison, R., Thurman, G.E., Thomas, G.M.
A simple and versitable harvesting device for processing radio-
active label incorporation into cells in microculture.
J. Immunol. Methods, 4, 11 (1974)
- 31 Hartzman, R.J., Segall., Bach, L., Bach, F.H.
Histocompatibility matching 4, Miniaturation of the lymphocyte
culture test: A preliminary report.
Transplantation, 11, 268 (1971)
- 32 Hippius, H., Kanig, K., Selbach, H.
2. Weltkongress der Psychiatrie, Zürich 1957
zitiert nach: Naumann, G., Wilde, S.
Untersuchungen des Bluteiweißspektrums und dessen pharmakologi-
sche Beeinflussung.
Ärztl. Forsch. 12, 476 (1958)
- 33 Hirschberg, H., Thorsby, E.
The role of serum in human mixed lymphocyte cultures.
Cellular Immunity, 16, 115 (1975)
- 34 Hurvitz, D., Hirschhorn, J.
Suppression of in vitro lymphocyte cultures by chlôroquine.
N. Engl. J. Med. 273 23 (1965)
- 35 Jungi, W., Fischer, J., Senn, H., Hartlapp, J., Pöldinger, W.,
Kunz, H., Krupp, P.
Gehäufte durch Clozapin induzierte Agranulozytosen in der Ost-
schweiz?
Schweiz. Med. Wschr. 107, 1862 (1977)
- 36 Knight, S.C., Farrant, J., Morris, G.J.
Separation of human lymphocytes by freezing and thawing.
Nature New Biol. 239, 88 (1972)
- 37 Lawrence, H.S., Landy, M.
Mediators of cellular immunity.
Academic Press, New York (1969)
- 38 Ling, N.R. Kay, J.E.
Lymphocyte stimulation
American Elsevier Publishing Co. Inc., New York (1975)
- 39 MacKinney, A.A.
Dose response curve of phytohaemagglutinin in tissue culture
of normal human leukocytes.
Nature, 204, 1002 (1964)

- 40 MacKinney, A.A., Vyas, R.
The assay of diphenylhydantoin effects on growing human lymphocytes.
J. Exp. Ther. 186, 37 (1973)
- 41 Makler, B.
Effect of con a on human lymphoid cell lines and normal peripheral lymphocytes.
J. National Cancer Institut, 49, 4 (1972)
- 42 Müller, U.
Medikamentös allergische Schäden des Blutes.
Schweiz. Med. Wschr. 105, 1065 (1975)
- 43 Nowell, P.C.
Phytohaemagglutinin: A initiator of mitosis in normal human lymphocytes.
Cancer Res. 20, 462 (1960)
- 44 Özek, M., Töreci, K., Akkök, J., Güvener, Z.
Die Wirkung der Neuroleptika auf die Antikörperbildung.
Psychopharmakologia 21, 401 (1971)
- 45 Opelz, G., Terasaki, P.I., Hirata, A.A.
Suppression of lymphocyte transformation by aspirin.
Lancet, 2, 478 (1973)
- 46 Oppenheim, J.J.
Relationship of in vitro lymphocyte transformation to delayed hypersensitivity reaction in guinea pig and man.
Fed. Proc. 27, 21 (1968)
- 47 Papergiu, P.S.
The cultered lymphocyte in clinical and experimental medicine.
Lymphology 5, 80 (1972)
- 48 Philipps, B., Weisrose, E.
The mitogenic response of human B lymphocytes to phytohaemagglutinin.
Clin. Exp. Immunol. 16, 383 (1974)
- 49 Pisciotta, A.V.
Agranulocytosis induced by certain phenothiazine derivates.
J. Americ. Med. Assoc. 208, 1862 (1969)
- 50 Pisciotta, A.V.
Drug induced leukopenia and aplastic anemia.
Clin. Pharmacol. and Ther. 12 (1972)

- 51 Pisciotto, A.V., Westring, D.V.
Mitogenic effect of phytohaemagglutinin at different ages.
Nature, 215, 193 (1967)
- 52 Purtilo, D.T., Hallgren, H.M., Yunis, E.J.
Depressed maternal lymphocyte response to phytohaemagglutinin
in human pregnancy.
Lancet, 1, 769 (1972)
- 53 Rodt, H., Thierfelder, S., Thiel, E., Götze, D., Netzel, B.,
Huhn, D., Eulitz, M.
Identification and quantification of human T cell antigen by
antisera purified from antibodies crossreacting with hemopoietic
progenitors and other blood cells.
Immunogenetics, 2, 411 (1975)
- 54 Ruppelt, W., Grosse-Wilde, H., Netzel, B.
Computer program for the evaluation and interpretation of MLC data.
Z. Immun. Forsch. 152, 293 (1976)
- 55 Sachs, L.
Angewandte Statistik.
Berlin, Heidelberg, New York pp 422-429 (1974)
- 56 Schäfer, T.W., Pascale, A., Shimonasky, G., Came, P.E.
Evaluation of Gentamycin for use in virology and tissue culture.
Applied Microbiology vol. 23 No. 3 p 565 (1972)
- 57 Schellekens, P.T.A., Eijssvoegel, V.P.
Lymphocyte transformation in vitro: Tissue culture conditions
and quantitative measurements.
Clin. Exp. Immunol. 3, 571 (1968)
- 58 Shortman, K., Byrd, W.J., Cerottini, J.C., Brunner, K.T.
Characterisation and separation of mouse lymphocyte subpopu-
lation responding to PHA and PWM.
Cell. Immunol. 6, 25 (1975)
- 59 Tavadia, H.B., Fleming, K.A., Hume, P.D., Simpson, H.W.
Circadian rhythmicity of human plasma cortisol and PHA-
induced lymphocyte transformation.
Clin. Exp. Immunol. 22, 190 (1975)
- 60 Thierry, C., Turc, J.M., Valles, H., Serron, B.
Routine technique of lymphocyte cryopreservation evaluated
by in vitro tests of immune response.
Europ. J. Cancer 13, 367 (1977)

- 61 Tsancheva, M.

Sravitelno prouchvane na de' istviето na khaloperidola i mazhep-tila vurkhu kariotika i immunoproliferativnѝa otgovor na limfotsita.

Comparative studies of the effect of haloperidol and maptil on the karyotype and immunoproliferative response of lymphocytes. Eksp. Med. Morfol. 15 (3) 182 (1976)

- 62 Weiner, R.C.

Cryopreservation of lymphocytes for use in vitro assays of cellular immunity.

J. Immunol. Methods, 10, 49 (1967)

9. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. H. Grosse-Wilde und Herrn Professor Dr. med. H. Hippius danke ich für die Überlassung des Themas der Dissertation. Herrn Professor Grosse-Wilde möchte ich dabei vor allem für die Anleitung zur experimentellen Arbeit mit wertvollen Hinweisen zur immunologischen Problematik und für die letztlich zügige Korrektur danken. Professor Hippius gilt mein Dank für die Unterstützung im klinischen Teil der Arbeit und für das Koreferat.

Besonders danke ich den Patienten der Nervenklinik, deren Einverständnis zur Blutentnahme die Arbeit erst ermöglichte, sowie den Schwestern, Pflegern und Ärzten für ihre wichtige Hilfe.

Allen Mitarbeitern des hämatologischen Instituts / München Landwehrstraße sei gedankt für wertvolle Zusammenarbeit, besonders den Assistentinnen von Prof. Grosse-Wilde, Frau Silvia Kowalev, Fräulein Ursula Ettner und Fräulein Marianne Schiefer.

Herrn Kurt Baumgartner gilt mein besonderer Dank für loyale Zusammenarbeit und manches aufmunternde Wort.

Herrn Professor Dr. med. W. Spann möchte ich für seine Hilfe danken.

Allen Freunden und Kommilitonen danke ich für anregende Diskussionen und für psychologische Unterstützung.

Schließlich möchte ich meinen Eltern dafür danken, daß sie mir eine höhere Schulbildung ermöglichten und dadurch den wichtigsten Anstoß für meinen Werdegang gaben.

8. Lebenslauf

Ich wurde am 12. 6. 1954 in Dinkelshausen / Landkreis Neuburg-Schrobenhausen als fünftes Kind des Bauern Benno Baur und dessen Ehefrau Anna geborene Daferner geboren.

Die Verbandsvolksschule in Hollenbach / Landkreis Neuburg-Schrobenhausen besuchte ich von 1960 bis 1964 und danach 1964/65 im Missionsinternat der Benediktiner die fünfte Klasse der Volksschule. Ab 1965 war ich Schüler im Johann-Michael Sailer Gymnasium in Dillingen, wo ich 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Zurückstellung von der Bundeswehr studierte ich von 1974 bis 1981 an der Ludwig-Maximilian Universität in München Humanmedizin. Am 18. 5. 1981 bestand ich den dritten und letzten Teil der ärztlichen Prüfung und am 22. 5. 1981 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Zur Zeit arbeite ich als chirurgischer Assistent an der Privatklinik Dr. Riefler in München und werde am 4. 1. 1982 meinen Zivildienst an der Filder-Klinik in Bonlanden bei Stuttgart antreten.

